

論文の内容の要旨

氏名：荒井 俊明

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：***Actinomyces naeshundii* GroEL-dependent initial attachment and biofilm formation in a flow cell system**
(GroELに依存した *Actinomyces naeshundii* の初期付着とフローセル法によるバイオフィルム形成について)

口腔内には 700 種類以上の微生物が存在し、これらの細菌はバイオフィルムを形成することで歯面や舌、頬粘膜に付着し増殖する。また、上顎洞炎や、歯性感染症に起因する顔面領域の膿瘍等においても細菌がバイオフィルムを形成することが知られている。成熟したバイオフィルムは微生物の増殖に適した環境であり、抗菌薬に対する抵抗性を持つことから、歯科口腔外科領域の感染症に対する治療を行う上で問題となっている。

口腔内初期付着細菌の 1 つである *Actinomyces naeshundii* は、歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* の代謝産物の 1 つである酪酸との相互作用によって GroEL の産生が促進することが明らかとなっている。GroEL は、熱ショックタンパク質の 1 つであり、細菌の蛋白質の構造の安定性に関与すると言われている。近年、GroEL の産生がバイオフィルム形成に関与することが、過去の報告によりマイクロタイタープレートを用いた方法において明らかにされた。バイオフィルムを研究するには、静止系であるマイクロタイタープレート法以外に流路系であるフローセル法が用いられている。フローセル法によるバイオフィルム形成実験法は、マイクロタイタープレート法とは異なり、培養液を循環させることで、細菌の代謝による栄養源の枯渇と pH の低下、それに伴う細菌の死滅を防ぐことができ、さらに培養液の循環による培養条件を一定に且つ長時間の連続培養が可能となる。また、フローセル法のように流れがあるという環境は、静止系よりも、より口腔内に近い環境を再現している実験方法である。

そこで本研究では、*A. naeshundii* のバイオフィルム形成に酪酸が与える影響について検討するために、フローセル法を用いて実験を行った。また、フローセル法におけるバイオフィルム形成に *A. naeshundii* の初期付着が関与していることを考慮し、*A. naeshundii* の初期付着に対する酪酸の効果についても 6 穴マイクロタイタープレートを用いて検討を行った。GroEL と初期付着の関連性についても併せて検討を行った。

予備実験として、酪酸が *A. naeshundii* の浮遊細菌の生育に与える影響を検討するために、培養液中の様々な酪酸濃度(0, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mM)を設定し、*A. naeshundii* を 37°C、好気条件下で培養した。酪酸を添加することで培地中の pH は低下する。そこで、低 pH のバイオフィルムへの効果を検討するために、塩酸を用いて培養液中の pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) をそれぞれ調整し、同様の条件下で培養し、浮遊細菌の生育を観察した。

フローセル法を用いたバイオフィルム形成実験では、菌接種後、培養液の循環を止めて初期培養を 3 時間行い、セル内に細菌を付着させた。初期培養後、様々な濃度の酪酸が含まれた (0, 6, 30, 40, 50, 60 mM) 培養液を流速 3.0 ml/h でセル内に流し、37°C、48 時間バイオフィルム形成実験を行った。形成されたバイオフィルムは、LIVE/DEAD 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。バイオフィルムの定量には COMSTAT を用いた解析を行った。

浮遊細菌の生育に対する酪酸の影響について検討した結果、30 mM 以上酪酸を加えると生育しない事が明らかとなった。30 mM の酪酸を加えると pH は 5.5 に低下し、塩酸添加 pH5.5 以下の培地でも生育は見られなかった。よって、この酪酸の生育抑制効果は低 pH によると考えられる。しかし、バイオフィルム形成実験では、60 mM 酪酸を添加することで、他の濃度よりも有意に厚いバイオフィルム形成を観察できた。pH 低下の影響を回避するために 60 mM 酪酸ナトリウムを添加することで pH に影響されない条件を検討した。その結果、60 mM 酪酸ナトリウム (pH7.0) ではバイオフィルムが形成されなかった。バイオフィルム形成に低 pH がどうかを観察するために、60 mM 酪酸添加時の培養液 pH を水酸化ナトリウムにより 4.7 から 7.0 に調整した条件と 60 mM 酪酸ナトリウム添加時の培養液 pH を塩酸により 7.0 から 4.7 に調整した条件を設定し、それぞれの条件によるバイオフィルム形成を検討した。その結果、60 mM 酪酸添加培地を pH7.0 にすると有意なバイオフィルム形成が見られなくなり、60 mM 酪酸ナトリウム添加培地を pH4.7 にすると有意なバイオフィルム形成が見られるようになった。次に酪酸に関係なく pH 低下のみがバイオフィルム形成に必要かどうかを観察するために、各酪酸濃度添加時(30, 40, 50, 60 mM)と同じ pH(5.5, 5.0, 4.9, 4.7)を塩酸によって調整し、バイオフィルム形成量の比較を行った。その結果、60 mM 酪酸に対応する pH4.7 培地では、60 mM 酪酸添加時と同等のバイオフィル

ム形成を誘導することができなかつた。これらの結果から、このバイオフィーム形成には酪酸と低 pH の両方が必要であることが明らかとなった。

A. naeshundii のバイオフィーム形成に対して酪酸の影響がある事を考え、初期付着に対してはどうか検討する実験を行った。フローセル法における初期培養と同じ条件で 37°C、好気条件下で 3 時間培養した後、培養上清を捨て、続いて 60 mM 酪酸を添加した新たな培養液を加え、1 時間培養した際の *A. naeshundii* の付着を LIVE/DEAD 染色を行い観察した。

その結果、60 mM 酪酸は、*A. naeshundii* における浮遊細菌の生育を抑制する濃度であっても、有意な初期付着を誘導することが明らかとなった。しかし、pH4.7 培地、60 mM 酪酸添加 pH7.0 培地、60 mM 酪酸ナトリウムでは、有意な初期付着を観察することができなかつた。よって、60 mM 酪酸によるバイオフィーム形成には初期付着が大きく関与している事が明らかとなった。また、60 mM 酪酸ナトリウム pH4.7 と 6 mM 酪酸に乳酸を加えて pH4.7 にした培地のどちらも有意な初期付着を誘導した。これらの結果も酪酸を含む培地の pH が低下すれば有意なバイオフィームを形成することを示唆している。

以前の論文で行ったマイクロタイタープレートを用いた実験の結果で、*A. naeshundii* に対する酪酸の効果に GroEL の産生が関与していることが明らかとなった。そこで、GroEL との関連性についても検討した。GroEL のポリクローナル抗体を初期培養時から添加すると、酪酸によって誘導された *A. naeshundii* の初期付着は有意に抗体により抑制された。これらの結果から、フローセル法における *A. naeshundii* のバイオフィーム形成には酪酸と低 pH が必要であり、GroEL を介した初期付着の促進がバイオフィーム形成に深く関与していることが明らかとなった。

本研究により、酪酸によって誘導された *A. naeshundii* のフローセル法における GroEL 依存バイオフィーム形成が確立され、その形成メカニズムの一部を明らかにすることができた。